

Aus dem Institut für Klinische Physiologie,
Klinikum Steglitz, Hindenburgdamm 30, 1 Berlin 45

Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

Volumenregulation bei Erythrozyten (Amphiuma Means)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Dieter Ledwa
aus Berlin

Berlin 1978

Aus dem Institut für Klinische Physiologie,
Klinikum Steglitz, Hindenburgdamm 30, 1 Berlin 45

Direktor: Prof. Dr. med. K. Hierholzer

Volumenregulation bei Erythrozyten (Amphiuma Means)

Inaugural-Dissertation

zur

Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin



vorgelegt von

Hans-Dieter Ledwa

aus Berlin

Berlin 1978

Referent: Priv.-Doz. Dr. C. Behn

Korreferent: Professor Dr. H. Brücher



Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche
der Freien Universität Berlin

Promoviert am: 5.7.78

Inhalt

1.0	<u>Einführung</u>	1
1.1	<u>Methoden</u>	2
1.2	<u>Methoden</u>	3
2.1	<u>Themen</u>	4
2.1.1	<u>Themen</u>	4
2.1.1.1	<u>Themen</u>	4
2.1.1.2	<u>Themen</u>	4
2.1.2	<u>Themen</u>	4
2.2	<u>Methoden</u>	5
2.2.1	<u>Methoden</u>	5
2.2.2	<u>Methoden</u>	5
2.2.3	<u>Methoden</u>	5
2.2.4	<u>Methoden</u>	5
2.2.5	<u>Methoden</u>	5
2.3	<u>Methoden</u>	6
3.1	<u>Methoden</u>	7
3.2	<u>Methoden</u>	7
3.3	<u>Methoden</u>	7
3.4	<u>Methoden</u>	7
3.5	<u>Methoden</u>	7
3.6	<u>Methoden</u>	7
3.7	<u>Methoden</u>	7
3.8	<u>Methoden</u>	7
3.9	<u>Methoden</u>	7
3.10	<u>Methoden</u>	7

Meinen lieben Eltern
in Dankbarkeit gewidmet



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41548402_0074

Inhaltsverzeichnis

	Seite
1.0 <u>Einleitung</u>	3
2.0 <u>Methoden</u>	6
2.1 <u>Material</u>	6
2.1.1 Tiere	6
2.1.1.1 Herkunft	6
2.1.1.2 Haltung	7
2.1.2 Gewinnung	8
2.2 <u>Versuchsablauf</u>	10
2.2.1 Präparation der Amphiuma-Erythrozyten	10
2.2.2 Perfusion	10
2.2.3 Meßvorgang	11
2.2.4 Geometrie der Amphiuma-Erythrozyten	18
2.2.5 Auswertung und Statistik	19
3.0 <u>Ergebnisse</u>	20
3.1 <u>Längsdurchmesser der Amphiuma-Erythrozyten</u>	20
3.2 <u>Kontrollen</u>	21
3.3 <u>Vincristin</u>	22
3.4 <u>Cytochalasin B</u>	23
3.5 <u>Dimethyladipimidat</u>	24
3.6 <u>KCl</u>	25
3.7 <u>NaCl</u>	26
3.8 <u>Ca-freie Lösung</u>	27
3.9 <u>CaCl₂</u>	28
1.10 <u>NaCl + CaCl₂</u>	29

	Seite
4.0 <u>Diskussion</u>	30
4.1 <u>Zur Methodik</u>	30
4.1.1 Zum Versuchsobjekt	30
4.1.2 Durchmesser- und Volumenänderungen	32
4.2 <u>Zu den Ergebnissen</u>	35
4.2.1 Osmotische Eigenschaften von Zellen	35
4.2.2 Osmoregulation in hypotoner Umgebung	37
4.2.3 Mechanismen der Volumenregulation	38
4.2.4 Mechanische Regulation	39
4.2.5 Osmotische Regulation	40
4.2.6 Amphiuma-Erythrozyten	41
4.2.6.1 Mechanische Eigenschaften	41
4.2.6.2 Osmotische Eigenschaften	43
5.0 <u>Anhang</u>	48
6.0 <u>Zusammenfassung</u>	51
7.0 <u>Literatur</u>	52

1.0 Einleitung

Zellen euryhaliner Tiere schwellen in hypotoner Umgebung nach dem Van't Hoff-Gesetz an, stellen dann jedoch trotz Hypotonie des Mediums ihr Ausgangsvolumen wieder her (34, 53). Dieses Phänomen wurde von Schoffeniels (43) als intrazelluläre isosmotische Regulation bezeichnet. Kregenow (31) beschrieb bei Erythrozyten in hypotoner Lösung ein initiales Anschwellen der Zellen mit darauffolgender langsamer Rückkehr zum Ausgangsvolumen. Dellasega und Grantham fanden bei Nierentubuluszellen ähnliche Ergebnisse (12).

Einem vergrößerten Volumen kann die Zelle grundsätzlich durch zwei Mechanismen entgegentreten:

- 1) Durch Kontraktion kann Flüssigkeit abgepreßt werden.
- 2) Durch Verringerung der Zahl osmotisch wirksamer Teilchen innerhalb der Zelle sinkt der intrazelluläre osmotische Druck und Wasser strömt aus.

Einen Kontraktionsmechanismus vermutet Kleinzeller bei Zellen von Nierenrindenschnitten (cf. 29). Er stellte bei osmotischer Schwellung einen Na^+ -, Cl^- - und Wasserausstrom aus der Zelle fest, der trotz Hemmung der Na-K ATPase durch Strophantin nicht verhindert werden konnte, aber energieabhängig war. Auch Rangachari et al. (56) fanden bei Na^+ -angereicherten Zellen (Ratten-Myometrium) einen energieabhängigen Na^+ -Ausstrom, der durch Strophantin nicht gehemmt werden konnte und schlossen daraus auf einen kontraktilen Vorgang.

Einen osmotischen Mechanismus der zellulären Volumenregulation beschrieben Kregenow (31) und Dellasega und Grantham (12).

Die in hypotoner Lösung geschwollenen Zellen (Erythrozyten und Nierenzellen) sollen ihr Volumen durch Ausstrom von K^+ , Cl^- und Wasser regulieren. Dabei konnte die Volumenregulation durch erhöhte extrazelluläre Konzentration von K^+ verhindert werden. Diese Autoren schlossen auf eine erhöhte Membranleitfähigkeit für K^+ , das entlang einem Konzentrationsgefälle ausströmt und Wasser mit sich zieht.

Sowohl die K^+ -Leitfähigkeit der Membran (21) als auch die kontraktilen Vorgänge der Zelle, sind Ca^{++} -abhängig (60). Es ist daher möglich, daß Calcium auch bei der zellulären Volumenregulation eine Rolle spielt. Parker et al. (52) fanden, daß für die Volumenregulation von Hunde-Erythrozyten, die durch Ausstrom von Na^+ , Cl^- und Wasser erfolgt, Ca^{++} notwendig ist.

Ziel dieser Arbeit ist es, ein Modell zum Studium der zellulären Volumenregulation zu gewinnen. Dazu eignen sich Amphiuma-Erythrozyten besser als die von Parker et al. untersuchten Hunde-Erythrozyten (52). Letzteren fehlt eine ATP-abhängige, durch Strophantin hemmbare Na^+-K^+ -Pumpe (51), die bei Amphiuma-Erythrozyten vorhanden ist (35). Während die Hunde-Erythrozyten K^+ -arm und Na^+ -reich sind (50), entsprechen die Amphiuma-Erythrozyten in ihrer ionalen Zusammensetzung den Körperzellen des Menschen (35). Gegenüber diesen besitzen Amphiuma-Erythrozyten den Vorteil ihrer Größe (mittleres Erythrozytenvolumen bei Amphiuma: $13000 \mu m^3$; Mensch: $90 \mu m^3$), die Untersuchungen an Einzelzellen erleichtert. Als freie Zellen werden Amphiuma-Erythrozyten bei Volumenänderungen von der Umgebung mechanisch nicht beeinflußt. Die im Normalzustand diskusähnliche Form läßt bei Volumenzunahme typische Formveränderungen erwarten.

Die Untersuchungen sollen feststellen, wie sich das Zellvolumen von Amphiuma-Erythrozyten in hypotonem, nicht hämolysierendem Medium verhält. In dem Fall, daß eine Volumenregulation zu beobachten ist, wäre zu klären, ob diese durch Kontraktion, durch osmotische Regulation oder durch beide Mechanismen gleichzeitig erfolgt. Dazu wäre der Einfluß von Substanzen zu prüfen, die die Kontraktion von Mikrofibrillen hemmen (z.B. Cytochalasin B (11)), die die Kontraktion solcher Strukturen auslösen (z.B. Vincristin (7)), oder die mechanischen Eigenschaften der Zellmembran ändern (z.B. Dimethyladipimidat (32, 47)).

Es ist zu erwarten, daß Ausmaß und Richtung möglicher Diffusionsvorgänge bei der Volumenregulation von der extrazellulären Konzentration der diffundierenden Teilchen abhängig sind. Zur Frage ionaler Transportvorgänge bei der zellulären Volumenregulation sollte der Einfluß von Änderungen extrazellulärer Ionenkonzentration auf diesen Vorgang untersucht werden.

Für diese Arbeit wurde ein Perfusionssystem entwickelt, das erlaubt, bei fortlaufender Registrierung das Volumen einzelner lebender Zellen unter wechselnden osmotischen Bedingungen zu bestimmen. Es gelang, Amphiuma-Erythrozyten an der Unterseite eines Deckglases anzuheften und dabei Volumenänderungen mit Hilfe mikroskopischer und mikrophotographischer Verfahren zu messen.

Das Volumen von Amphiuma-Erythrozyten nahm in hypoosmolaler Lösung wie erwartet zu, kehrte dann aber wieder zum Ausgangswert zurück. Diese Volumenregulation wurde untersucht unter dem Einfluß von a) Änderungen

der extrazellulären Ionenzusammensetzung und b) von Substanzen, die in die Zellmechanik eingreifen.

2.0 Methoden

2.1 Material

2.1.1 Tiere

2.1.1.1 Herkunft

Es wurden Erythrozyten der Spezies *Amphiuma means tridactylum* Cuvier aus der Klasse der Amphibien verwendet. Die Familie der *Amphiumae* aus der Ordnung der Schwanzlurche (Caudata) hat zwei Arten. *Amphiuma means tridactylum* Cuvier und *Amphiuma means means*, die sich hauptsächlich durch Art der Färbung, Ausbreitung und Anzahl der Zehen unterscheiden (1,2). Die hier benutzte dreizehige Tierart *Amphiuma means tridactylum* Cuvier (Abb. 1), im folgenden mit *Amphiuma* bezeichnet, besitzt neben den Lungen auch eine Kiemenanlage. Die Atmung erfolgt bei den älteren Tieren durch die Lungen, Haut und Mundschleimhaut, während die Kiemenatmung zurückgebildet ist (4, 73). Im amerikanischen Schrifttum wird auch der Name Congo eel verwendet, im deutschen der Name Aalmolch. *Amphiuma* hat einen auf dem Rücken schwärzlichen, am Bauch gräulichen aalartigen Körper mit winzigen Gliedmaßen (1), bei einer Länge bis zu 100 cm und einem Gewicht bis zu 1000 g (27). *Amphiuma* lebt nur im Süßwasser und bevorzugt Sümpfe und moorartige Stellen (2, 5). Sein Lebensraum sind die Überschwemmungsgebiete



Abb. 1: *Amphiuma means tridactylum* Cuvier

des Mississippi mit seinen Zuflüssen von Louisiana bis Missouri (2, 5). Die dort gefangenen Tiere wurden von Carolina Biological Supply Comp., Burlington, N.C. per Luftpost bezogen.

2.1.1.2 Haltung

Die Tiere wurden in einem abgedunkelten, mit Leitungswasser gefüllten Kasten (90 x 65 x 30 cm) gehalten. Das Wasser wurde alle zwei Tage gewechselt. Die Nahrung bestand aus 5 g Putenleber/Tier und Woche. Die Tiere wogen 150 - 500 g bei einer Länge von 30 - 60 cm. Sie wurden innerhalb von drei Monaten nach Ankunft verwendet.

2.1.2 Gewinnung des Blutes

Die Versuchstiere wurden ebenfalls für nieren-physiologische Experimente verwendet. Daraus ergab sich folgende Präparation (25): Die Aorta und das Portalvenensystem (Schwanzvene) wurden kanuliert und mit Amphiuma-Ringer mit Heparinzusatz (1000 I.E./l) (Tab. I) perfundiert (Aorta 1ml/min; Vena cauda 2ml/min). Das aus der Vena cava fließende Blut-Ringer-Gemisch wurde durch einen Katheter aufgefangen. Die Versuche wurden an spontan sedimentierten Zellen durchgeführt.

Tabelle I

	isoosmolal (202 mosmol/kg H ₂ O)*	Amphiuma- Ringer	Standard	KCl	NaCl	Ca frei (61 mosmol/kg H ₂ O)*	CaCl ₂	Na + Ca
NaCl	(mmol/l) 75,0		2,0	-	30,0	2,0	-	20,0
KCl	(mmol/l) 3,0		3,0	30,0	-	3,0	-	-
CaCl ₂	(mmol/l) 1,8		1,8	-	-	-	22,0	10,0
MgCl ₂	(mmol/l) 1,0		1,0	-	-	-	-	-
Na ₂ HPO ₄	(mmol/l) 0,56		0,56	-	-	0,56	-	-
NaH ₂ PO ₄	(mmol/l) 0,14		0,14	-	-	0,14	-	-
NaHCO ₃	(mmol/l) 20,0		20,0	-	-	20,0	-	-
Albumin ₁	(g/l) 20,0		20,0	-	-	20,0	-	-
Glycin	(mg/l) 250,0		250,0	-	-	250,0	-	-
Glucose	(mg/l) 200,0		200,0	-	-	200,0	-	-
Heparin ₂	(I.E./l) 1000,0		-	-	-	-	-	-
EGTA ₃	(mmol/l) -		-	-	-	1,0	-	-

1) Albumin 96 - 99 %, Sigma Chemical Company, St. Louis USA

2) Thrombophob, Nordmark Werke GmbH

3) Äthylenglykol-bis (2-aminoäthyläther) N,N'-tetraessigsäure, Serva, Heidelberg

* Bestimmung durch Gefrierpunktsmessung (elektrisches Halbmikroosmometer, Knauer, Berlin)

2.2 Versuchsablauf

2.2.1 Präparation der Amphiuma-Erythrozyten

Die Zellen wurden zunächst gewaschen. Dafür wurden 10 μ l der spontan sedimentierten Erythrozyten in 400 μ l isoosmotischer NaCl-Lösung (Zimmertemperatur) suspendiert. Nach Zentrifugation (10 s) mit der Eppendorf Zentrifuge 3200 wurde der Überstand verworfen und die Zellen wieder mit der NaCl-Lösung (400 μ l) aufgeschüttelt. Dieser Vorgang wurde noch einmal wiederholt. 20 μ l dieser Suspension gewaschener Erythrozyten wurden auf ein silikonisiertes Deckglas (Tab. II) übertragen. Hier blieb die unterste Schicht der sedimentierten Erythrozyten locker haften, jedoch nur wenn die Zellen wie beschrieben gewaschen wurden. Die Erythrozyten hafteten mit ihrer flachen Seite am Glas an, wenn die Sedimentationsdauer eine Minute und mehr betrug. Bei höherer Erythrozytenkonzentration (4 x) und kürzerer Sedimentationsdauer (20 s) hafteten ungefähr 10 % der Zellen mit ihrer Schmalseite (Rand) am Deckglas an. Anschließend wurde das Deckglas umgedreht. Die nicht haftenden Erythrozyten wurden mit der nachfolgenden Perfusion fortgeschwemmt.

2.2.2 Perfusion

Als Objektträger wurde der in Abb. 2 dargestellte Metallblock (Messing, vernickelt) an das Perfusions-system angeschlossen. Um die ausgebohrte Kammer wurde ein Ring aus Siliconpaste (P8, Wacker-Chemie GmbH, München) mit Hilfe einer 5 ml Spritze gelegt. Die Kammer wurde mit Amphiuma-Ringer (Tab. I) gefüllt.

Das Deckglas wurde mit den anhaftenden Erythrozyten nach unten auf den Siliconring gelegt und so ange-drückt, daß die Flüssigkeit das Deckglas benetzte und sämtliche Luft aus der Kammer entweichen konnte (Abb. 3). Mit der als Perfusor I bezeichneten Pumpe (Perfusor, Braun-Melsungen) wurde über einen Drei-Wege-Hahn die Kammer mit Amphiuma-Ringer durchströmt (9,49 ml/h). Dem durch die Pumpe und dem Widerstand im Ablauf bedingten Druck in der Perfusionskammer wurde durch eine höhenverstellbare Abflußöffnung ein leichter Unterdruck (ca. 5 cm Wassersäule) entgegengesetzt. Dadurch wurde das Deckglas von der Kammer nicht abge-hoben. Eine zweite Pumpe (Perfusor II) förderte währenddessen eine hypoosmotische Lösung (Tab. I + III) mit einer Flußrate von ebenfalls 9,49 ml/h durch den Drei-Wege-Hahn in den Ablauf (Abb. 3). Da bei den Pumpen nach Einschalten ein wechselnder Zeit-abschnitt (0-30 s) bis zum Förderbeginn verstrich, lief Perfusor II mit Versuchsbeginn parallel mit Perfusor I um die Meßzeit durch Umschalten des Drei-Wege-Hahnes genau zu bestimmen. Die Kammer wurde während 80 s mit Amphiuma-Ringerlösung durchströmt. Dabei wurden die losen Erythrozyten und der Rest der Waschlösung weggespült. Anschließend wurde der Drei-Wege-Hahn umgeschaltet, so daß die Amphiuma-Ringer-lösung in den Ablauf und die hypoosmotische Lösung in die Perfusionskammer lief. 40 s später erreichte die hypoosmotische Lösung die Kammer. Von diesem Zeitpunkt an wurde gemessen (Pfeil, Abb. 4).

2.2.3 Meßvorgang

Die Perfusionskammer wurde auf den Objektstisch eines Mikroskopes (Orthoplan 512 362, Leitz, Wetzlar) gelegt.

Tabelle II

Silikonisieren der Deckgläser

Die Deckgläser werden nacheinander in die Flüssigkeiten 1 - 8 eingetaucht; modifiziert nach Gräßman (23).

- 1) Aceton DAB 6
- 2) Äthylmethyleketon, vergällt
- 3) Methanol, absolut
- 4) Tetrahydrofuran, rein (Merck 8114)
- 5) Dichlordimethylsilan (Merck-Schuchardt 803452)
in Tetrahydrofuran im Verhältnis 1/10
- 6) Tetrahydrofuran, rein
- 7) Methanol, absolut
- 8) Äthylmethyleketon, vergällt
- 9) 12 h im Trockenschrank (120° C)

Tabelle III

Vinc:	Standard-Lösung + 0,11 mmol/l Vincristinsulfat	[*] ₁
Cyto B:	Standard-Lösung + 42 μ mol/l Cytochalasin B	^{**} ₂
DMA:	Standard-Lösung + 5 mmol/l Dimethyladipimidat	[*] ₃

- 1) Vincristin, Lilly GmbH, Gießen
- 2) Cytochalasin B, Serva, Heidelberg
- 3) Dimethyladipimidat Dihydrochlorid, Serva, Heidelberg

* 65 mosmol/l;

** Als Lösungsvermittler für Cytochalasin B wurde nach Wessels et al. (70) ein Prozent Dimethylsulfoxid (DMSO, Merck 82912) verwendet. DMSO hat in dieser Konzentration nach Wessels et al. (70) keinen Einfluß auf die von Cytochalasin B beeinflussten Prozesse. Der osmotische Druck der DMSO-Moleküle beeinflusst nicht das Zellvolumen, da DMSO durch die Zellmembran leicht permeabel ist (8, 40, 45) und damit kein Druckgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum entsteht.

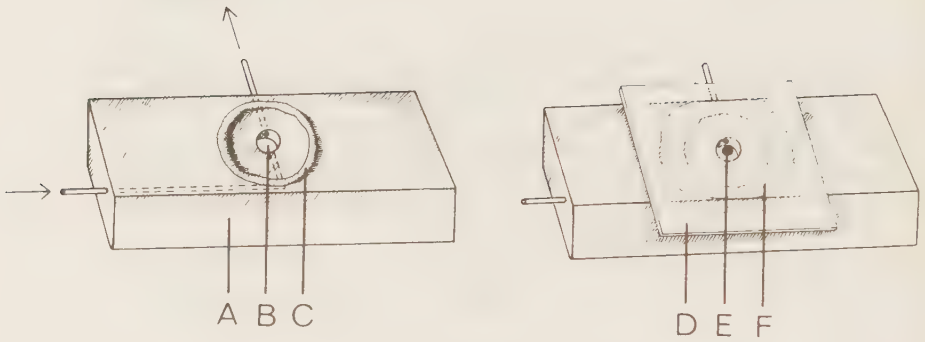


Abb. 2: Perfundierbarer Objektträger

links: offen; rechts: mit aufgelegtem Deckglas

A = Metallblock, B = Perfusionskammer, C = Ring

aus Siliconpaste, D = Deckglas, E = Präparat an

der Deckglasunterseite, F = Siliconpaste verstrichen

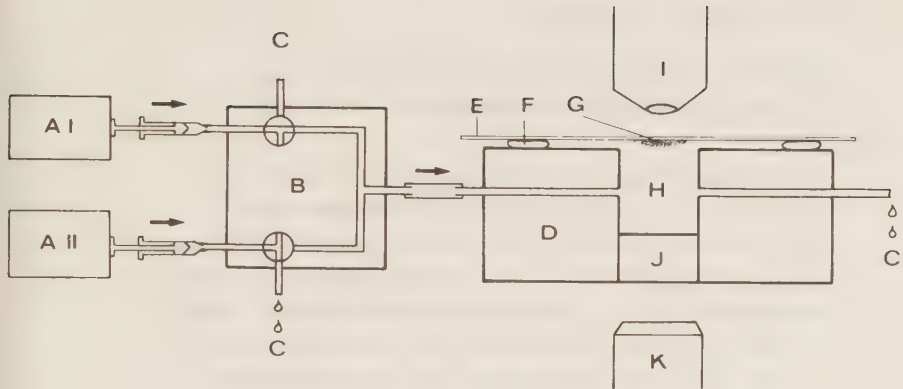


Abb. 3: Perfusionssystem

A I	Perfusor I	F	Siliconpaste
A II	Perfusor II	G	Präparat
B	Drei-Wege-Hahn	H	Perfusionskammer
C	Ablauf	I	Objektiv
D	Metallblock	J	Plexiglas
E	Deckglas	K	Kondensor

In der Zeit C (Abb. 4) wurde mit der Vergrößerung 1:196 ein geeigneter Erythrozyt ausgesucht, wobei folgende Kriterien berücksichtigt wurden:

- 1) Planes Anliegen am Deckglas, erkennbar durch einen gleichmäßig scharfen Zellrand
- 2) Homogenes Zytoplasma
- 3) Schwach gezeichneter Zellkern (69)
- 4) Kern-Plasmagrenze verwaschen

Der Längsdurchmesser wurde zu den in Abb. 4 (Abschnitt D) mit Strichmarken angegebenen Zeitpunkten bestimmt. Bei den Versuchen 3.2 und 3.6 - 3.10 (Inhaltsverzeichnis) wurde mit Hilfe einer in den Strahlengang eingeblendeten Skala der Längsdurchmesser (LD) bei einer Vergrößerung von 1:781 direkt am Objekt gemessen. Bei den Versuchen 3.3 - 3.5 wurden die Zellen zu den einzelnen Zeitpunkten mit einer automatischen Mikroskopkamera (Orthomat-W, 543 225, Leitz, Wetzlar) photographiert. Die Negative wurden auf eine Leinwand projiziert und der LD der abgebildeten Zellen in cm gemessen. Durch die Projektion ergab sich eine Vergrößerung der Zellen von 1:1640. Daraus ergab sich ein Verkleinerungsfaktor von $6,10 \cdot 10^{-4}$, für die Reduktion auf die ursprüngliche Größe (μm).

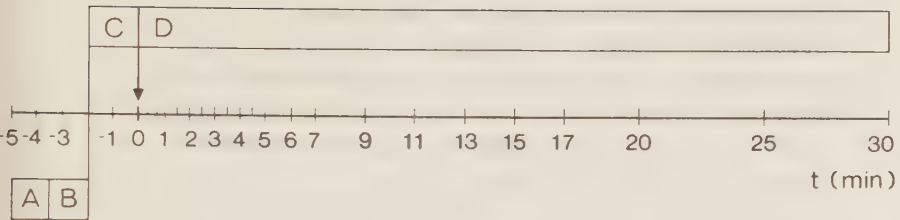


Abb. 4: Versuchsablauf

- A = Waschen der Amphiuma-Erythrozyten
- B = Sedimentation der Zellen
- C = Perfusion mit Amphiuma-Ringerlösung
(120 s). Nach 80 s Umschalten des
Drei-Wege-Hahnes.
- D = Perfusion mit hypoosmotischer Lösung
(Meßzeit)

2.2.4 Geometrie der Amphiuma-Erythrozyten

Die Amphiuma-Erythrozyten haben eine elliptische, diskusähnliche Form (Abb. 5). Chang (9) errechnete eine Zelloberfläche von ca. $5000 \mu\text{m}^2$. Pape (49) gab das Volumen mit $13000 \mu\text{m}^3$ an bei einem Längsdurchmesser von $60 \mu\text{m}$. Die Angaben des mittleren LD schwanken je nach Autor und Präparation der Zellen zwischen 54 und $75 \mu\text{m}$ ($46, 64, 66, 74, 75$). Das größtmögliche Volumen wäre bei gleichbleibender Oberfläche durch eine Kugel gegeben. Diese hätte bei einer Oberfläche von $5000 \mu\text{m}^2$ ein Volumen von $33200 \mu\text{m}^3$. Der Durchmesser würde dann lediglich $39,9 \mu\text{m}$

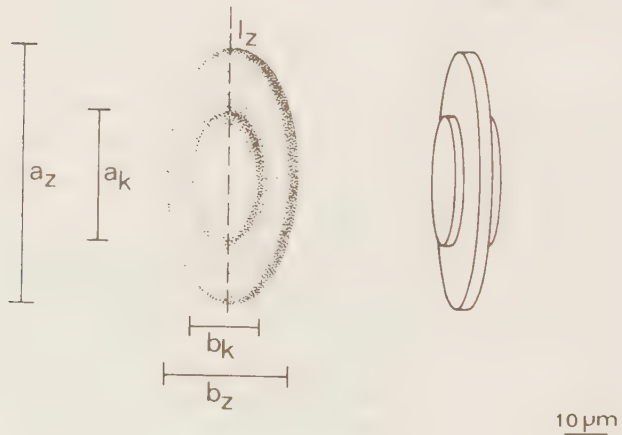


Abb. 5: Geometrie der Amphiuma-Erythrozyten

links: Aufsicht, a_z = LD Zelle, a_k = LD Zellkern, b_z = Querdurchmesser Zelle, b_k = Querdurchmesser Zellkern, l_z = Längsachse der Zelle,
rechts: Schrägansicht

betragen. Ohne Vergrößerung der Oberfläche können solche Zellen durch Übergang von der diskoiden zur Kugelform also $33200 - 13000 = 20200 \text{ } (\mu\text{m}^3)$ oder ca. das 1,6-fache ihres Ausgangsvolumens zusätzlich aufnehmen. Die mittlere Durchmesseränderung wäre dabei 33 %. Daraus ergibt sich, daß Vergrößerungen des Volumens, unter Annahme einer konstanten Oberfläche, bei diesen Zellen zu einer Abnahme des LD führen müssen (s. 4.1.1 und Anhang). Dementsprechend wurden Änderungen des LD verwendet, um Volumenänderungen der Zelle zu erfassen.

2.2.5 Auswertung und Statistik

Die einzelnen Versuchswerte wurden in einen Kleinrechner (PDP8/E, Digital Equipment International ltd.) eingegeben. Durch ein Fortran II Programm wurden die Mittelwerte der einzelnen Versuchsserien mit dem jeweiligen Fehler des Mittelwertes (SEM) errechnet. Die Kurven wurden mit einem Digital Incremental Plotter (Complot DP-1, Houston Instrument) gezeichnet.

Zur Beurteilung der Ergebnisse wurden zweiseitige Nullhypothesen formuliert und mit dem t-Test für ungepaarte Werte geprüft. Alle als signifikant verschieden bezeichneten Werte unterschieden sich mit $2P < 0,001$.

3.0 Ergebnisse

3.1 Längsdurchmesser der Amphiuma-Erythrocyten

In hypoosmotischen Lösungen schollen die Amphiuma-Erythrocyten an und veränderten ihre Gestalt einer flachen elliptischen Scheibe zu der einer Kugel hin. Ihr Längsdurchmesser vergrößerte sich (initialer Anstieg) mit dem Einsetzen der hypoosmolalen Perfusion um maximal 1,2 % (Abb. 7) bis 6,1 % (Abb. 15) je nach Perfusionslösung. Diese Werte wurden zwischen 20 s und 1,5 min nach Versuchsbeginn erreicht. Mit weiterer Volumenzunahme der Erythrozyten verringerte sich der Längsdurchmesser wieder, unterschritt den Ausgangswert und nahm bis zu 37,1 % ab (s. 3.5). Nach dem initialen Anstieg verkürzte sich der Längsdurchmesser also unter den Wert in isoosmotischer Lösung und entsprach der unter 2.2.4 postulierten Änderung (Abb. 6-15 und Anhang). Bei weiterhin hypoosmotischer Lösung nahm anschließend der Längsdurchmesser wieder zu als Ausdruck einer regulatorischen Volumenabnahme der Zelle.

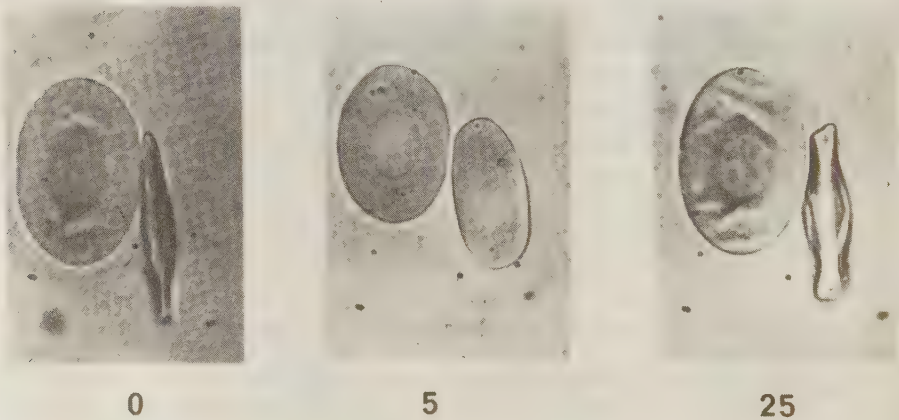


Abb. 6: Gestaltänderung von Amphiuma-Erythrozyten in Abhängigkeit der Zeit (min) bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (s. 3.5).

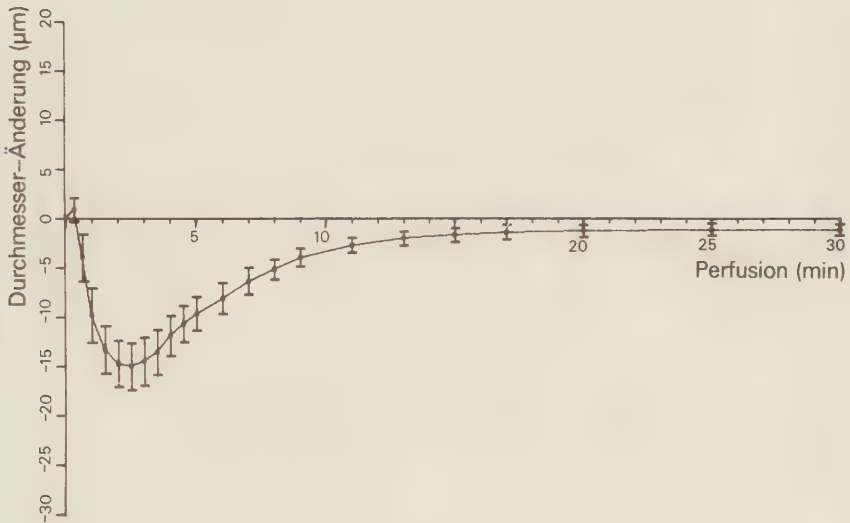


Abb. 7: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Standard, Tab. I).
Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 12$.

3.2 Kontrollen (Abb. 7)

20 s nach Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Standard, Tab. I) vergrößerte sich der Längsdurchmesser (LD) um 1,2 % und fiel dann nach 2,5 min auf seinen kleinsten Wert ab, bei einer LD-Verkürzung von 20,0 %. Darauf vergrößerte er sich wieder kontinuierlich bis zur 30. Minute und lag dann 1,5 % unter dem Ausgangswert.

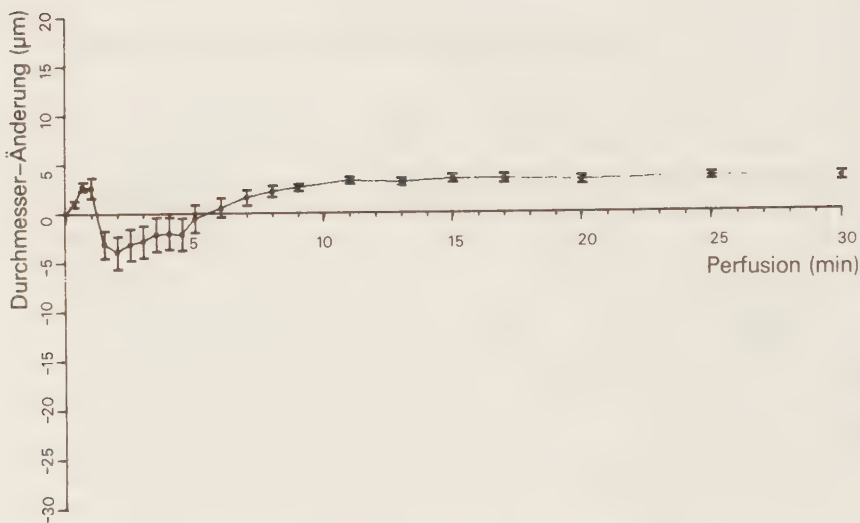


Abb. 8: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Standardlösung und Vincristinsulfat 0,11 mmol/l, Tab. III) Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 13$

3.3 Vincristin (Abb. 8)

Die größte LD-Verkürzung (2 min) war mit 5,5 % deutlich geringer als die der Kontrollen (20 %). Anschließend war eine Volumenverkleinerung zu beobachten, die in der 11. Minute abgeschlossen war. Der LD war dabei um 4,6 % größer als der Ausgangswert und etwas größer als der des initialen Anstieges (4,0 %).

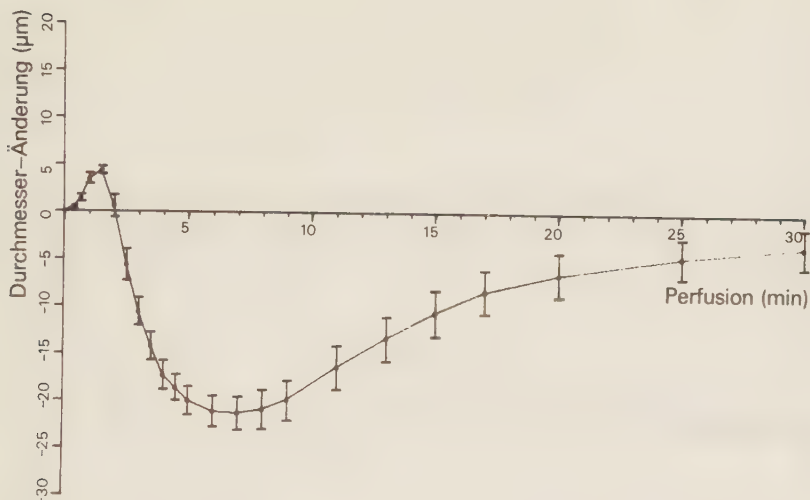


Abb. 9: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Standardlösung und Cytochalasin B $42 \mu\text{mol/l}$, Tab. III). Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 10$.

3.4 Cytochalasin B (Abb. 9)

Das Volumen nahm gegenüber den Kontrollen langsam zu - langer initialer Anstieg (1,5 min) und anschließende langsame LD-Verkürzung - und erreichte seinen größten Wert in der 7. Minute mit einer LD-Verkürzung von 28,3 %. Anschließend nahm das Volumen wieder ab, ein Vorgang, der bis zum Versuchsende noch nicht abgeschlossen war. In der 30. Minute betrug die LD-Verkürzung noch 4,5 %.

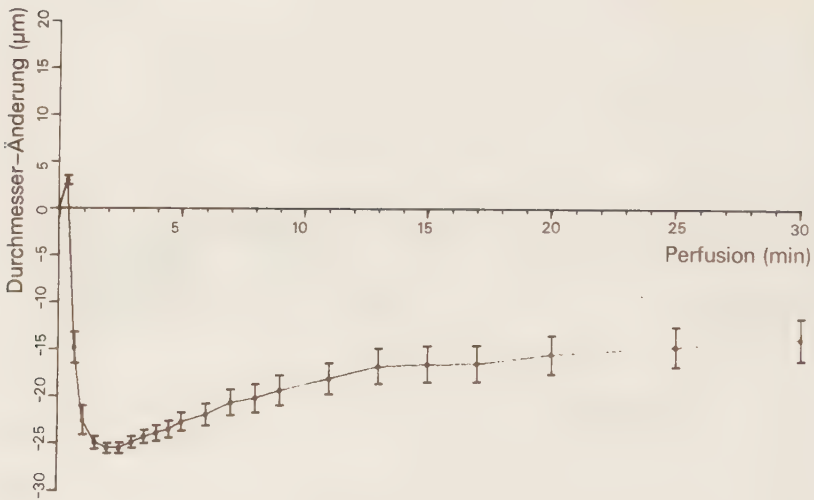


Abb. 10: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Standardlösung und Dimethyladipimidat 5 mmol/l, Tab. III). Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 12$.

3.5 Dimethyladipimidat (Abb. 10)

Das Zellvolumen nahm schnell zu. In der 2. Minute hatten die Erythrozyten Kugelform bei einer LD-Verkürzung von 37,1 %. Danach nahm das Volumen nur mäßig ab bei einer LD-Verkürzung von 20,0 % nach 30 Minuten hypoosmotischer Perfusion.

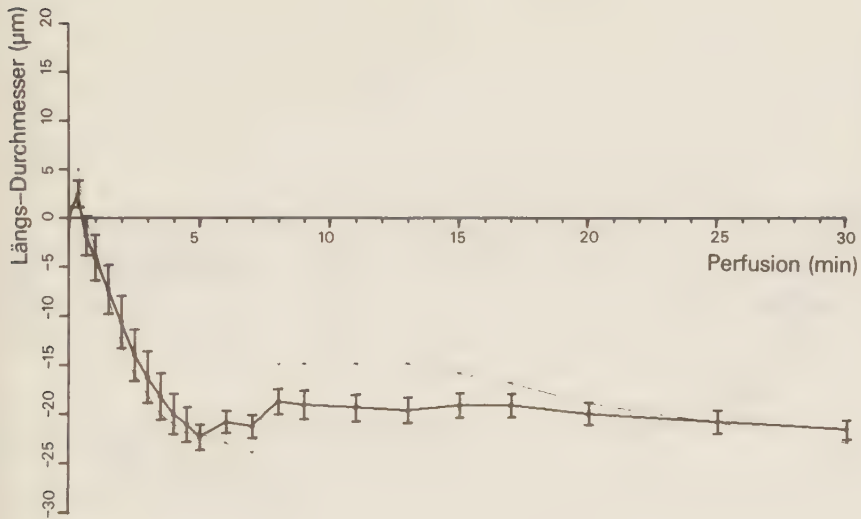


Abb. 11: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten (dick gezeichnete Kurve) bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (KCl 30 mmol/l, Tab. I). Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 12$. Einzelkurve (dünn gezeichnete Kurve)

3.6 KCl (Abb. 11)

Nach Versuchsbeginn erhöhte sich das Zellvolumen stetig bis die Zellen abgerundet waren ($\text{LD} = 30,6 \%$). Dann hämolysierten sie offensichtlich in der 5. bis 8. Minute (Abb. 20) und nahmen unter Substanzverlust eine leicht ellipsoide Form an ($\text{LD} = -25,7 \%$). Nach der Hämolyse rundeten sich die Zellen langsam wieder bis zum Versuchsende ab ($\text{LD} = -30,0 \%$). Der Zeitpunkt der Hämolyse ist in der Einzelkurve als sprunghafte Zunahme des LD zu erkennen (Abb. 11). Durch die zeitlich unterschiedlich gelegenen Rupturen der einzelnen Zellen erstreckt sich der entsprechende LD-Anstieg in der Mittelwertskurve von der 5. bis 8. Minute.

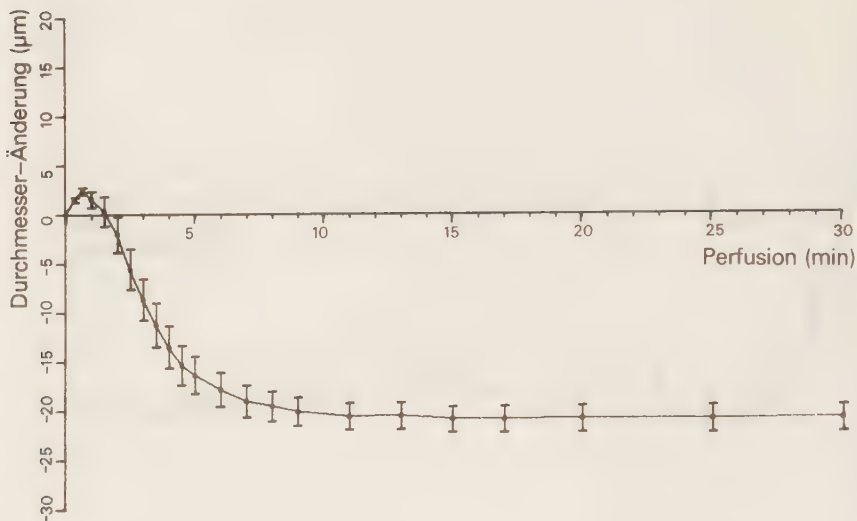


Abb. 12: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (NaCl 30 mmol/l, Tab. I).
Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 12$.

3.7 NaCl (Abb. 12)

Das Zellvolumen nahm langsamer zu als bei der Kontrolle. Der Rauminhalt der Erythrozyten vergrößerte sich dabei stetig bis die Zellen Kugelform hatten (11. Minute). Danach veränderte sich das Volumen bis zum Versuchsende nicht mehr (LD = - 27,9 %).

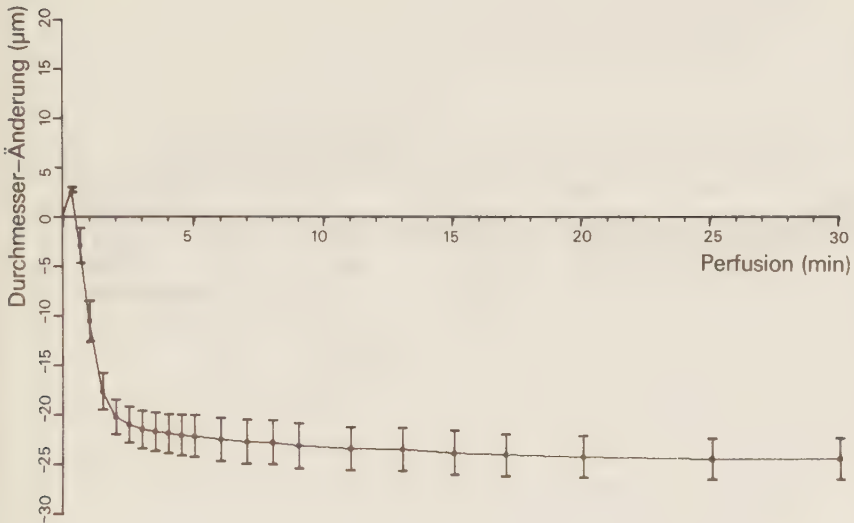


Abb. 13: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Ca frei, Tab. I).
Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 15$.

3.8 Ca-freie Lösung (Abb. 13)

Das Volumen der Zellen nahm schnell zu. Nach 2.5 min betrug die LD-Verkürzung schon 28,2 % (bei der Kontrolle 20,0 %). Bis zum Versuchsende nahm das Volumen noch etwas zu und die Zellen hatten in der 30. min alle Kugelform (LD-Verkürzung 33,3 %).

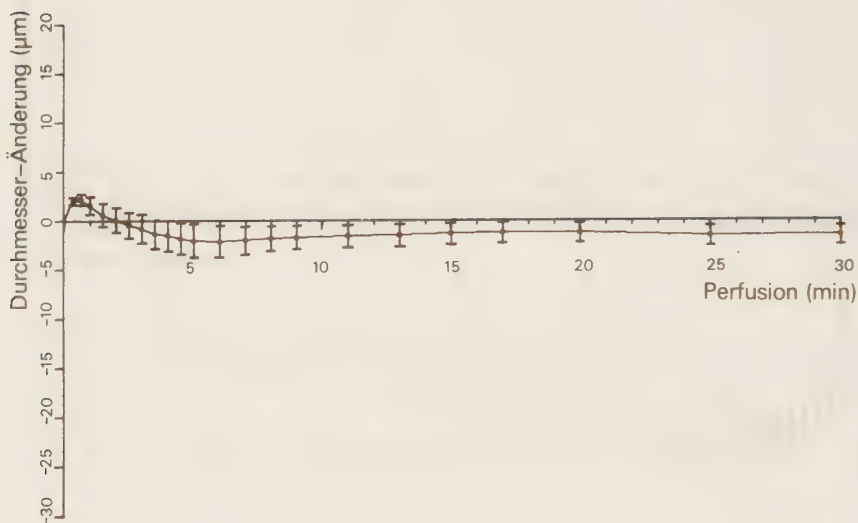


Abb. 14: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (CaCl_2 22,0 mmol/l, Tab. I). Mittelwerte $\pm$ SEM, $n = 14$.

3.9 CaCl_2 (Abb. 14)

Das Volumen vergrößerte sich nur geringfügig in der hypoosmotischen Lösung. Der größte Rauminhalt der Zellen war in der 6. min erreicht bei einer LD-Verkürzung von nur 2,7 %. Bis zum Versuchsende nahm der Rauminhalt wieder geringfügig ab. Die LD-Verkürzung betrug in der 30. min 1,9 % (in der Kontrolle 1,5 %). Weder der 5 min-Wert noch der Wert der 30. min waren vom Ausgangswert signifikant verschieden.

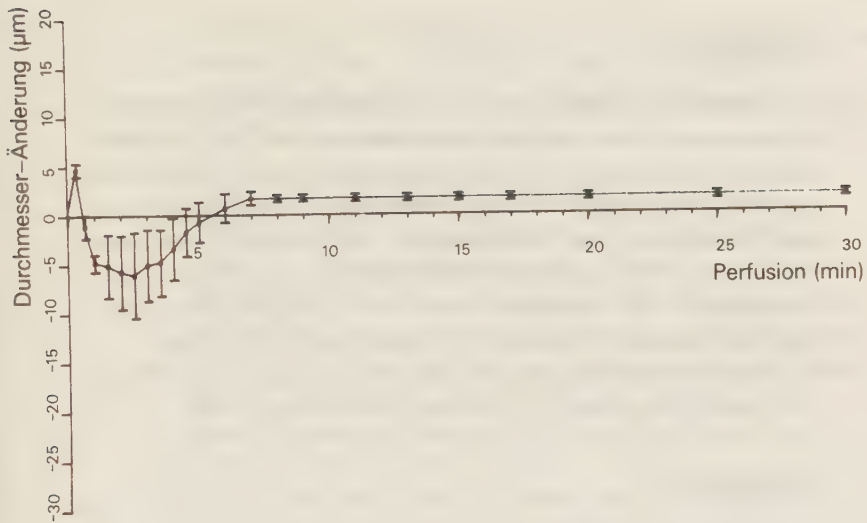


Abb. 15: Längsdurchmesser-Änderung (μm) von Amphiuma-Erythrozyten bei Perfusion mit hypoosmotischer Lösung (Na + Ca, Tab. I).
Mittelwerte $\pm$ SEM, n = 3.

3.10 NaCl + CaCl₂ (Abb. 15)

Das Volumen nahm mit Versuchsbeginn zu und erreichte nach 2,5 min wie bei der Kontrolle seinen größten Wert, war aber mit einer LD-Verkürzung von 7,9 % deutlich kleiner als beim Kontrollversuch. Darauf nahm das Volumen wieder ab. Dieser Vorgang war in der 7. min abgeschlossen. Anschließend änderte sich der Rauminhalt bis zum Versuchsende nicht mehr. Der LD war dabei um 2,2 % größer als der Ausgangswert.

4.0 Diskussion

Die Untersuchungen zeigen, daß *Amphiuma*-Erythrozyten in hypoosmolalen Lösungen anschwellen und ihr Volumen spontan regulieren. Diese Volumenregulation fand auch statt bei Hemmung der Mikrofibrillen (Cytochalasin B) oder Schädigung der Mikrotubuli (Vincristin). Bei Vernetzung der Zellmembran (Dimethyladipimidat) war sie verringert. Die Volumenregulation erfolgte nur, wenn die hypoosmolale Lösung Ca^{++} -Ionen enthielt. Die initiale Volumenzunahme war um so geringer, je höher die extrazelluläre Ca^{++} -Ionenkonzentration war.

4.1 Zur Methodik

4.1.1 Zum Versuchsobjekt

Erythrozyten der Tierart *Amphiuma means tridactylum* Cuvier sind die größten bekannten roten

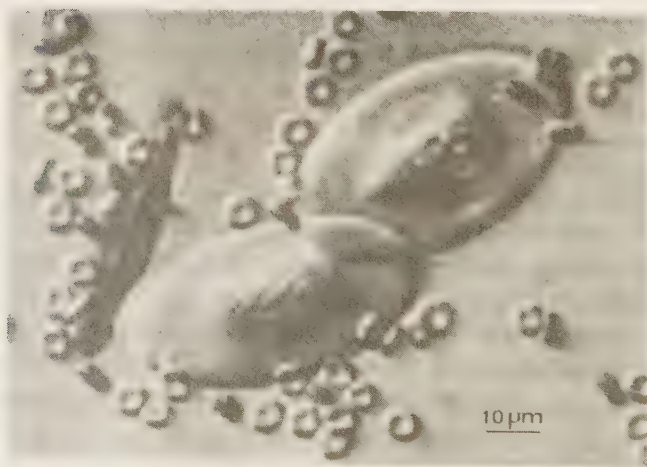


Abb. 16: Menschliche Erythrozyten (Längsdurchmesser 7,5 µm, bikonkav) neben *Amphiuma*-Erythrozyten (Längsdurchmesser 60 µm, elliptisch).

Blutzellen. Im Verhältnis zu menschlichen Erythrozyten (Abb. 16) ist ihr mittleres Volumen 144 mal und ihr mittlerer Längsdurchmesser 8 mal so groß.

Damit ist eine große Anzahl gleichförmiger, symmetrischer Zellen gegeben, die groß genug sind, um Volumenänderungen an einzelnen Zellen lichtmikroskopisch erfassen zu können. Durch die Verformung der flachen elliptischen Scheibe kann sich das Volumen um das 2,6 fache vergrößern unter der Annahme einer konstanten Oberfläche. Diese Annahme scheint gerechtfertigt. Nach Evans et al. (16) ist eine Ausdehnung der Oberfläche bei roten Blutzellen sehr gering. Diese Arbeitsgruppe fand bei menschlichen Erythrozyten bis zum Punkt der osmotischen Lyse eine relative Ausdehnung der Oberfläche von nur 3 %.

Die Größe der Amphiuma-Erythrozyten erlaubte es auch, an Hand morphologischer Kriterien (s. 2.2.3) beschädigte Zellen zu erkennen und nur intakte Zellen in die Messungen einzubeziehen.

Kaltblüterzellen können ihre Atmungsaktivität dem umgebenden Sauerstoffdruck anpassen (46). Da die metabolische Aktivität zur Zellgröße umgekehrt proportional ist (46, 64), sind Amphiuma-Erythrozyten mit ihrem Zellvolumen von durchschnittlich $13\,000\ \mu\text{m}^3$ (s. 2.2.4 und Anhang) sehr widerstandsfähig gegen verringerten Sauerstoffdruck. Auf eine Begasung des Perfusates wurde deshalb verzichtet.

4.1.2 Durchmesser- und Volumenänderungen

Amphiuma-Erythrozyten haben die Form flacher Zylinder mit elliptischer Grundfläche. Bei Volumenzunahme ändern sich Längsdurchmesser, Querdurchmesser und Dicke qualitativ und quantitativ unterschiedlich (Abb. 17).

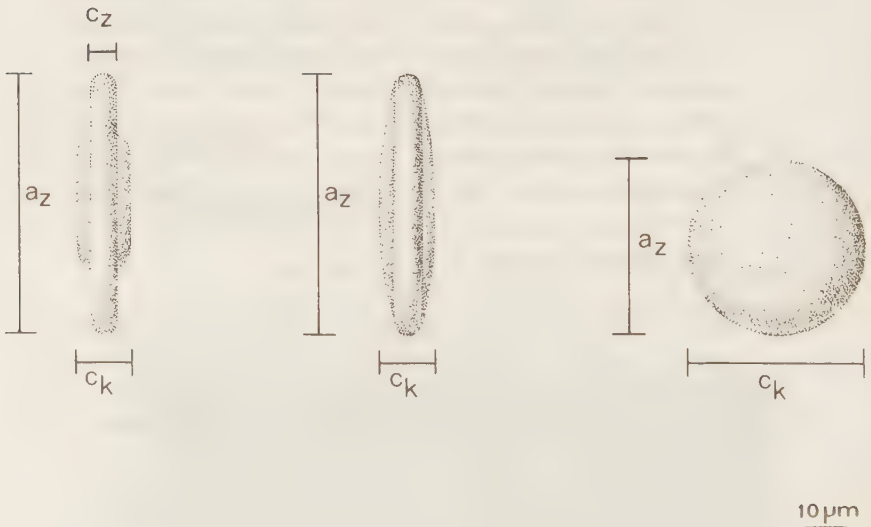


Abb. 17.: Formänderung von Amphiuma-Erythrozyten bei Volumenzunahme.

links: Ausgangsform in isoosmolalem Amphiuma-Ringer

mitte: Beginn der Volumenzunahme in hypoosmotischer Lösung

rechts: Maximale Volumenzunahme in nicht hämolysierender, hypoosmotischer Lösung

a_z = Längsdurchmesser,

c_z = Dicke des Zellrandes,

c_k = Dicke der Zellmitte.

Im Verhältnis zur Oberfläche enthält die Kugel das größtmögliche Volumen unter den geometrischen Körpern. Gegenüber den Ausgangswerten (s. Anhang) hat der Amphiuma-Erythrozyt bei Annahme der Kugelform in hypoosmotischer Lösung seinen Längsdurchmesser um $1/3$ verkleinert, den Querdurchmesser um $1/7$ vergrößert und die Dicke um das 2,2-fache erhöht.

Bei Volumenzunahme erfährt die Dicke die größte Änderung. Diese Größe kann man bestimmen, wenn die Zellen mit ihrem Rand am Deckglas anhaften und nach unten in die Perfusionsflüssigkeit hängen (s. 2.2.1). Dann ist die Dicke parallel zur Bildebene und wird in wirklicher Größe abgebildet. Tatsächlich erwies sich die Dicke jedoch als ungünstige Meßgröße. Bei Volumenzunahme änderte sich die Haftfläche und nach Volumenregulation hingen die Zellen meist schräg, so daß die Dicke nicht mehr parallel zur Bildebene lag und dadurch verkürzt erschien. Die randständig anhaftenden Zellen konnten außerdem nicht auf ihre Unversehrtheit geprüft werden (s. 2.2.3). Die dafür nötige Vergrößerung von 1: 196 ergab eine Tiefenschärfe von 6μ (13). Dabei ließ sich nur ein Ausschnitt der mit dem Rand anhaftenden Zellen scharf abbilden. Die darüber und darunter gelegenen Teile der Zellen verzerrten das Bild. Aus diesen Gründen war die Dicke als Meßgröße ungeeignet.

Sedimentierten gewaschene Erythrozyten in geringer Dichte, dann hafteten alle mit ihrer flachen

Seite am siliconisierten Deckglas. Dabei gab es drei Lagearten der Zellen:

- 1) Längs- und Querachse waren parallel zur Bildebene
- 2) Nur die Längsachse war parallel zur Bildebene
- 3) Nur die Querachse war parallel zur Bildebene

In den Positionen 1 und 2 wurde die Längsachse in wirklicher Länge vergrößert. In Position 3 wurde sie optisch verkürzt. Die Längsachse lag dann in einer Ebene senkrecht zur Bildebene mit dem Neigungswinkel α (Abb. 18).



Abb. 18: Schema eines Amphiura-Erythrozyten, der in Position 3 am Deckglas haftet.

D = Deckglas, l = Längsachse, α = Neigungswinkel

Aus den Maßen der Abb. 19 läßt sich $\tan \alpha$ berechnen:

$$\tan \alpha = \frac{(c_k - c_z) \cdot 1/2}{(a_z - a_k) \cdot 1/2} \approx 0,22$$

Daraus ergibt sich ein Winkel α von ca. 12° . Die optisch dargestellte Längsachse ist dabei um den Faktor $\cos \alpha$ verkürzt. Der daraus resultierende Fehler beträgt ca. 2 % und wurde vernachlässigt.

Die Unversehrtheit der Zelle konnte beim Anhaften mit der flachen Seite gut beurteilt werden, da hierbei die Zelldicke im Größenbereich der Tiefenschärfe ($6 \mu\text{m}$) lag. Die maximale Verkürzung des LD um $1/3$ entsprach einer Volumenänderung um das 2,6-fache. Die LD-Änderung war also umgekehrt proportional zur Volumenänderung.

4.2 Zu den Ergebnissen

4.2.1 Osmotische Eigenschaften von Zellen

Nach dem Van't Hoff'schen Gesetz (1886) ist der osmotische Druck $\tilde{\pi}$ in idealen Flüssigkeiten abhängig von der Temperatur und der Konzentration der gelösten Teilchen:

$$\tilde{\pi} = c \cdot 22,4 \cdot \left(1 + \frac{t}{273}\right)$$

Wenn die Konzentration c ein mol/l beträgt, ist $c = 1$. Bei $t = 0^\circ \text{C}$ beträgt dann der osmotische Druck $\tilde{\pi} = 2,27 \text{ MPa}$ ($22,4 \text{ atm}$).

Die Versuche von Lucké an Eiern wirbelloser

Meerestiere (41) zeigten, daß Zellen unter gewissen Voraussetzungen als osmotische Systeme betrachtet werden können. Sie schwellen im hypotonen Medium an und schrumpfen im hypertonen Medium, da die Zellmembran für Wasser leichter durchgängig ist als für osmotisch wirksame Teilchen. Die Volumenänderung wird dabei durch das Gesetz von Boyle-Mariotte beschrieben:

$$P \cdot V = \text{konstant} \quad (P = \text{Druck}, V = \text{Volumen})$$

Vom Zellvolumen muß dabei ein gewisser Prozentsatz an osmotisch unwirksamem Volumen (Strukturproteine, Lipide, unlösliche Kohlenhydrate) abgezogen werden, bei Arbacia Eiern z.B. 12 % (41, 42).

Im Außenmilieu von Zellen gibt es mannigfaltige Konzentrationsänderungen, durch die die Zellen nach den Gesetzen von Van't Hoff und Boyle-Mariotte Volumenschwankungen unterworfen werden. Euryhaline Tiere können den Wechsel zwischen See- und Brack- bzw. Süßwasser ertragen. Das bedeutet eine osmotische Druckdifferenz von ca. 2,28 MPa (22,5 atm). Beim Menschen ändert sich die extrazelluläre Konzentration bei Wasserintoxikation oder Hyponatriämie. Volumen und Zusammensetzung der Flüssigkeiten eines lebenden Organismus sind im Verlauf der Ontogenese wie auch der Phylogenese * enge Grenzen gesetzt. So ist eines der ersten Zeichen irreversibel geschädigter Zellen der Verlust der Volumenregulation (26).

* Die Extrazellulärflüssigkeit von Vielzellern ähnelt in ihrer Zusammensetzung derjenigen der Meere vor 300 Millionen Jahren (Paläozoikum) (43).

Eine Volumenvergrößerung von Zellen kann zu verschiedenen Schädigungen führen. Menschliche Erythrozyten beginnen bei ca. 85 mmol/l NaCl-Lösung zu hämolysieren. Große Volumenzunahme von Zellen im festen Verband zerreißt das Gewebe, wenn es sich frei ausdehnen kann. Eine Kompression ist die Folge, wenn die Ausdehnung durch eine feste Hülle begrenzt wird. Beim Gehirnödem durch Wasserintoxikation zeigen Kopfschmerzen, Erbrechen, Krämpfe, Koma und Tod den jeweiligen Grad der Schädigung an. Der erhöhte Gewebedruck verringert die Durchblutung des Organs. Bei experimenteller Myokardschädigung läßt sich die Widerstandserhöhung im Koronarkreislauf mit der Schwellung von Endothel- und Herzmuskelzellen zeitlich korrelieren (54). Durch hyperosmotische Mannitolinfusion nahm die Widerstandserhöhung und das Ausmaß der Schädigung ab (54). Ähnliches gilt auch für das akute Nierenversagen (18, 19).

4.2.2 Osmoregulation in hypotoner Umgebung

Untersuchungen an euryhalinen Tieren ergab, daß der intrazelluläre Gehalt an anorganischen Ionen und kleinen organischen Molekülen in hypertoner Umgebung wesentlich höher war als in hypotoner Umgebung (34, 53, 62). Dabei waren die Zellen jeweils isoton zu ihrer Umgebung und das Volumen unverändert. Die chronische Hyponatriämie (Abnahme der Na^+ -Konzentration im Plasma von 140 auf 120 mval/l) mußte eine 17 %ige Schwellung des Gehirns hervorrufen, bedingt jedoch keine Gehirn-

symptomatik (72). Das Gehirnvolumen bleibt trotz der extrazellulären osmotischen Druckerniedrigung konstant (17). Die Gehirnzellen haben ihr Volumen offensichtlich nicht verändert. Legt man isolierte Muskelfasern euryhaliner Krabben in hypotone Lösungen, so schwellen sie an. Nach ungefähr fünf Minuten beginnt jedoch das Volumen wieder abzunehmen und strebt dem Ausgangswert zu (34).

Nach Kregenow (31) kann die Reaktion von Enten-Erythrozyten im nicht hämolysierenden, hypotonen Medium in zwei Phasen geteilt werden:

- 1) Eine initiale, schnelle Volumenzunahme.
- 2) Eine anschließende, langsamere Volumenabnahme.

Die zweite Phase stellt die eigentliche Volumenregulation dar. Dellasega und Grantham konnten 1973 bei Nierentubuluszellen von Kaninchen im hypotonen Medium ebenfalls eine Volumenregulation nachweisen. Auch diese Zellen zeigten eine schnelle Volumenvergrößerung (30 s) und anschließend eine regulatorische Abnahme des Zellvolumens (12).

4.2.3 Mechanismen der Volumenregulation

Um der Volumenvergrößerung der Zellen bei Wassereinstrom in hypoosmotischer Umgebung entgegenzuwirken, sind nach dem Boyle-Mariottischen Gesetz grundsätzlich zwei Mechanismen denkbar:

- 1) Die Zelle setzt dem osmotischen Druck mechanischen Widerstand entgegen, entweder passiv durch eine feste Membran wie bei Kamel-Erythrozyten (39) und Pflanzen (57), oder aktiv durch Kontraktion und Auspressen des Wassers (mechanische Regulation).
- 2) Die Zelle verringert ihren Gehalt an osmotisch wirksamen Teilchen. Damit nimmt der Druckgradient zwischen Intra- und Extrazellulärraum ab (osmotische Regulation).

4.2.4 Mechanische Regulation

Die Körperflüssigkeit des Kamels ist großen osmotischen Konzentrationsschwankungen ausgesetzt. Es kann bis zu 30 % seines Körpergewichtes an Flüssigkeit verlieren ohne Schaden zu nehmen (63). Ein dehydriertes Kamel kann über 10 l Wasser pro Minute trinken (39). Trotz des starken Wassereinstromes in das Blut hämolysieren die Erythrozyten offensichtlich nicht (39). Kamel-Erythrozyten haben eine wesentlich höhere osmotische Resistenz als menschliche Erythrozyten. Auch ihre mechanische Widerstandsfähigkeit gegenüber Ultraschall ist höher (39). Diese Eigenschaften sind wahrscheinlich durch das größere Protein/Lipidverhältnis in der Zellmembran bedingt: Kamel 3,0, Mensch 1,25 (55). In Membranen von Kamel-Erythrozyten ist der Spectrinanteil besonders groß, wobei dieses Protein stärker an die Membran gebunden zu sein scheint als bei anderen Arten (55). Wird Spectrin aus der Membran herausgelöst, verändern Kamel-Erythrozyten ihre Form von flachen Ellipsen zu Kugeln (55). Spectrin scheint daher wesentlich für die Stabilität der Erythrozyten

verantwortlich zu sein. Palek et al. beschrieben bei "ghosts" menschlicher Erythrozyten kontraktile Proteine, die möglicherweise mit Spectrin identisch sind (48). Die Kontraktion der "ghosts" war Ca^{++} -abhängig und verbrauchte ATP. Weed et al. (68) postulieren eine Sol-Gel-Transformation des membrannahen Zytoplasmas menschlicher Erythrozyten unter dem Einfluß von Ca^{++} -Ionen. Die Spectrin-polypeptide - bei Gel-Elektrophorese nach Lösung der Erythrozytenmembran in Natriumdodecylsulfat (SDS) in den Banden 1 und 2 - bilden ein Netzwerk von Mikrofilamenten, das an der Innenseite der Erythrozytenmembran befestigt ist (44, 65). Möglicherweise handelt es sich dabei jedoch um Artefakte. Tilney und Detmers (67) fanden Filamente in mit Trypsin behandelten, nicht jedoch in unbehandelten "ghosts". Diese Autoren wiesen auch Actin in menschlichen Erythrozyten nach. Actin und Spectrin halten sich gegenseitig im unpolymerisierten Zustand, so daß die laterale Beweglichkeit von Membrankomponenten in Grenzen gehalten wird. Eine Beteiligung kontraktile Elemente an der Kontrolle von Zellvolumen und Zellform ist bisher nicht bewiesen.

4.2.5 Osmotische Regulation

Euryhaline Tiere erreichen eine Volumenzunahme durch Transport von freien Aminosäuren (34) bzw. Ninhydrin positiven Substanzen (20) aus der Zelle. Gehirnzellen regulieren ihr Volumen bei osmotischer Hypotonie durch Verlust von K^+ (17).

Sowohl bei Enten-Erythrozyten (31) als auch bei Nierentubuluszellen von Kaninchen (12, 24)

scheint die Volumenregulation durch Verlust der Zellen an KCl und Wasser zu erfolgen. Dabei scheint die Membranleitfähigkeit der geschwollenen Zellen für K^+ erhöht (12). Dementsprechend konnte die Volumenregulation verhindert werden, wenn extrazellulär die K^+ -Konzentration erhöht wurde (12, 31). Unter diesen Bedingungen konnten K^+ -Ionen nicht mehr aus der Zelle herausdiffundieren.

4.2.6 Amphiuma-Erythrozyten

Die vorliegenden Ergebnisse zeigen Wirkungen an Einzelzellen einer gemischten Population. Volumenänderungen waren bei diesen Zellen direkt sichtbar und konnten durch Veränderungen des Längsdurchmessers quantitativ erfaßt werden.

Nach einer schnellen Schwellung zeigten Amphiuma-Erythrozyten im hypotonen Medium eine zweite langsamere Phase der Volumenabnahme, entsprechend den Versuchen von Kregenow (31) und der Gruppe um Grantham (12, 24). Um den Mechanismus der Volumenregulation bei den Amphiuma-Erythrozyten zu untersuchen, wurden Bedingungen geschaffen, die hauptsächlich die mechanischen Eigenschaften und solche, die hauptsächlich die osmotischen Eigenschaften der Zellen beeinflussen.

4.2.6.1 Mechanische Eigenschaften

Dimethyladipimidat (DMA), ein bifunktionseller Imidoester, vernetzt die Proteine in der Erythrozytenmembran (15, 32, 47). So vorbehandelte Erythrozyten können selbst in aqua dest. nicht

hämolysiert werden (32, 47). Möglicherweise setzt dabei die Zelle dem osmotischen Wasser-einstrom durch eine starre Hülle passiv Widerstand entgegen. Im Fall der Amphiuma-Erythrozyten kann auch bei konstanter Oberfläche das Volumen durch Formveränderung zunehmen (s. Anhang). Dementsprechend beobachtet man auch in Gegenwart von DMA die Verkürzung des LD im hypoosmotischen Medium. Die anschließende LD-Vergrößerung ist gegenüber der Kontrolle signifikant geringer und mag dahin gedeutet werden, daß für die Volumenregulation die Membrankomponenten beweglich sein müssen. Andererseits ist bekannt, daß DMA in menschlichen Erythrozyten die K^+ -Leitfähigkeit der Membran vermindert (32). Die DMA-Befunde sprechen daher eher für einen osmotischen Mechanismus der Volumenregulation bei Amphiuma-Erythrozyten.

Auch die Ergebnisse mit Cytochalasin B geben keinen Hinweis für eine mechanische Regulation des Zellvolumens. Grundsätzlich wäre es möglich, daß durch Kontraktion von Mikrofilamenten der hydrostatische Druck in der Zelle ansteigt, und damit Wasser gegen den osmotischen Druck ausgepreßt wird. In diesem Fall wäre zu erwarten, daß eine Inaktivierung der Mikrofilamente die Volumenregulation aufhebt. In den verwendeten Konzentrationen vermag Cytochalasin B Mikrofilamente reversibel zu hemmen (11, 38, 70). In Gegenwart von 0,042 mmol/l Cytochalasin B waren weder Schwellphase (3 min) noch Regulationsphase (30 min) signifikant verschieden von den

Kontrollwerten. Demnach käme den Mikrofilamenten und damit einem kontraktilen Vorgang keine Bedeutung für die zelluläre Volumenregulation zu.

Der Spannungszustand der Mikrofilamente wird durch Mikrotubuli gesteuert (7). Spindelgifte wie Colchizin, Vincristin und Vinblastin zerstören die Mikrotubuli. Die Kontrolle über die Mikrofilamente geht damit verloren: Die Mikrofilamente kontrahieren sich (7). In Gegenwart von 0,11 mmol/l Vincristinsulfat war die Schwellung im hypoosmotischen Medium eingeschränkt. Eine Volumenregulation fand trotzdem statt. Gegen Ende des Versuches war der LD sogar signifikant größer als der entsprechende Kontrollwert. Diese Ergebnisse bestätigen, daß das Cytoskeletton (Mikrofilamente und Mikrotubuli) an der Volumenregulation der Zelle nicht signifikant beteiligt ist.

4.2.6.2 Osmotische Eigenschaften

Im hypoosmotischen KCl Medium (Tab. I) schollen die Amphiuma-Erythrozyten an und hämolysierten in der 5. - 8. Minute (3.6 und Abb. 11, 20). Eine Volumenregulation erfolgte nicht. Der 30 min -Wert des LD war signifikant geringer als der entsprechende Kontrollwert. Auch bei den Versuchen von Kregenow (31) und Dellasega et al. (12) war unter diesen Bedingungen keine Volumenregulation festzustellen. Eine Erhöhung

der K^+ -Außenkonzentration über 4,0 mmol/l hemmt bei menschlichen Erythrozyten "ghosts" den Netto-Ausstrom von K^+ (30). Damit ist ein Anhalt für eine Beteiligung des K^+ -Transportes in der Phase der Volumenregulation gegeben.

Den Einfluß von Ca^{++} auf die Membranpermeabilität für K^+ zeigen Potentialmessungen an Amphiuma-Erythrozyten (36). Extrazellulär erhöhtes Ca^{++} hyperpolarisiert die Zellen über eine Zunahme der K^+ -Permeabilität. Gardos fand 1958, daß die Membranleitfähigkeit für K^+ vom intrazellulären Ca^{++} abhängig ist (21). Dieser "Gardos Effekt" wird seitdem intensiv untersucht (14, 37, 59, 71). Die erhöhte K^+ -Leitfähigkeit kann durch Ca^{++} -Komplexbildner rückgängig gemacht werden. Auch bei menschlichen Erythrozyten "ghosts" führt eine erhöhte intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration zu einem erhöhten K^+ -Ausstrom (10, 58, 59). Die Möglichkeit einer Rolle des K^+ -Ausstromes für die Volumenregulation und die Abhängigkeit der K^+ -Permeabilität der Zellmembran von Ca^{++} legten nahe, den Einfluß von Ca^{++} auf die Volumenregulation zu untersuchen.

In Abwesenheit divalenter Kationen konnten die Amphiuma-Erythrozyten bei hypoosmotischer Umgebung ihr Volumen nicht regulieren (Abb. 12, 13). In Abhängigkeit von der Zugabe von Ca^{++} ließ sich der Effekt wiederherstellen (Abb. 15).

Enthielt die hypoosmotische Lösung Ca^{++} als einziges Kation, fand keine Schwellung der Zellen statt (Abb. 14).

Dafür, daß Ca^{++} an der Volumenregulation über eine Wirkung auf die K^{+} -Permeabilität beteiligt ist, sprechen auch Versuche von Lake, Rasmussen und Goodman (33). Diese Autoren untersuchten den Einfluß des Ionophoren A23187 auf die osmotische Fragilität von menschlichen - und Kröten-Erythrozyten. Sie beobachteten, daß eine Zunahme der intrazellulären Ca^{++} -Konzentration durch Anwendung des Ionophoren (10^{-7} mol/l) in Gegenwart von 1 mmol/l Ca^{++} im äußeren Medium zu einer Zunahme der osmotischen Resistenz und gleichzeitiger Abnahme der intrazellulären K^{+} -Konzentration führt, ohne daß sich dabei die intrazelluläre Na^{+} -Konzentration geändert hätte. Bei erhöhter extrazellulärer K^{+} -Konzentration bewirkte der Ionophor jedoch keine erhöhte osmotische Resistenz, obgleich die Ca^{++} -Aufnahme erhöht war. Diese Versuche sprechen dafür, daß Ca^{++} über seine intrazelluläre Konzentration und damit über einen K^{+} -Ausstrom die Volumenregulation der Zelle ermöglicht. Grundsätzlich die gleichen Ergebnisse wurden an Kröten-Erythrozyten gewonnen, wobei 10-fach höhere Ionophorkonzentrationen verwendet werden mußten, um eine erhöhte osmotische Resistenz zu bewirken. Wiederum konnte bei diesen Zellen der Einfluß des intrazellulären Ca^{++} auf die osmotischen

Eigenschaften durch eine Erhöhung der extrazellulären K^+ -Konzentration verhindert werden. Die Unterschiede in der Empfindlichkeit beider Zellarten auf den Ionophoren wird auf die Anwesenheit intrazellulärer Organellen (Kern, Mitochondrien) im Falle der Kröten-Erythrozyten zurückgeführt, die damit eine erhöhte Speicherkapazität für intrazelluläres Ca^{++} haben. Daraus geht hervor, daß zunächst die intrazelluläre Ca^{++} -Konzentration ansteigen muß, um den erhöhten K^+ -Ausstrom zu bewirken.

Der permeabilitätsfördernde Effekt des intrazellulären Ca^{++} ist möglicherweise auf eine Wechselwirkung des Ca^{++} mit der Zellmembran zurückzuführen. Romero (59) fand eine direkte Beziehung zwischen Menge des membrangebundenen Ca^{++} und der K^+ -Permeabilität der Erythrozytenmembran. Dieser Membraneffekt des Ca^{++} kommt nicht etwa durch Verdrängung eines anderen Ions (Mg) aus der Membran zustande, sondern scheint an die Besetzung spezifischer Bindungsplätze für Ca^{++} gebunden zu sein. In diesem Zusammenhang sind Untersuchungen von Juliano, Kimelberg und Papahadjopoulos zu erwähnen, die ergeben, daß für die permeabilitätssteigernde Wirkung von Ca^{++} an künstlichen Phospholipidmembranen die Gegenwart einer hohen Dichte anionischer Bindungsplätze notwendig ist. Bekanntlich enthält die zytoplasmatische Hälfte der Erythrozytenmembran

mehr negativ geladene Phospholipide (Phosphatidylserin) als die äußere Hälfte (6). Komplexe aus Protein, Lipid und Ca^{++} haben nach Juliano et al. eine größere Anionendichte als reine Lipidmembranen und dementsprechend eine höhere Affinität für Ca^{++} (28). Untersuchungen der Verteilung von Ca^{++} in der Erythrozytenmembran weisen darauf hin, daß Ca^{++} tatsächlich vorwiegend die innere Seite der Membran besetzt (3).

Neben der Erhöhung der K^+ -Permeabilität durch Ca^{++} auf der Innenseite der Membran ist der bekannte stabilisierende Einfluß dieses Kations auf die Struktur von Membranen vorhanden. So führen Kationen zu einer verstärkten Kondensation der Membranteile durch Abdecken der negativen Ladungen der Lipide und Proteine und dadurch zu einer erhöhten Stabilisierung der Strukturen (22). Werden anorganische Kationen aus dem Medium durch Chelatbildner entfernt oder durch organische Kationen ersetzt, dann ist der gesamte Proteinanteil von menschlichen Erythrozyten "ghosts" im wässrigen Medium löslich. Wird hingegen die Konzentration anorganischer Kationen erhöht, so verringert sich auch die Proteinlöslichkeit (57). Divalente Kationen haben dabei einen mehrere 100 mal stärkeren Effekt als monovalente Kationen (cf. 22). Es scheint, daß dieser membranstabilisierende Effekt von der extrazellulären Kationenstärke abhängig ist (61).

Ca^{++} -Ionen tragen in jedem Fall zur Erhaltung des Zellvolumens bei: Sie erschweren die osmotisch bedingte Schwellung der Zelle durch Stabilisierung der Membran und erleichtern die Rückkehr zum Ausgangsvolumen, indem sie den Ausstrom von K^+ aus der Zelle fördern.

5.0 Anhang

Zur Bestimmung von Oberfläche und Volumen der Amphiuma-Erythrozyten wurde das Modell in Abb. 5 zugrunde gelegt. Der Zellkörper wurde als flacher Zylinder mit elliptischer Grundfläche dargestellt, die seitlichen Kernausbuchtungen als zentral auf-sitzende, kleinere, elliptische Zylinder. Bei Zellen mit einem Längsdurchmesser (LD) von $60 \mu\text{m}$ wurden unter isoosmotischen Bedingungen die Werte der Abb. 19 gemessen. Nach der Formel für das Volumen (V_i) eines solchen Körpers

$$V_i = \tilde{h} \cdot \frac{a_z}{2} \cdot \frac{b_z}{2} \cdot c_z + \tilde{h} \cdot \frac{a_k}{2} \cdot \frac{b_k}{2} \cdot 2 \cdot (c_k - c_z)$$

errechnet sich ein Wert von $13\,000 \mu\text{m}^3$ und nach der Formel für die Oberfläche (O_i)

$$O_i \approx 2 \cdot \tilde{h} \cdot \frac{a_z}{2} \cdot \frac{b_z}{2} + 4,43 \cdot \sqrt{\left(\frac{a_z}{2}\right)^2 + \left(\frac{b_z}{2}\right)^2} \cdot c_z \\ + 4,43 \cdot \sqrt{\left(\frac{a_k}{2}\right)^2 + \left(\frac{b_k}{2}\right)^2} \cdot (c_k - c_z)$$

ein Wert von $4\,780 \mu\text{m}^2$. Schwoill eine Zelle mit dem ursprünglichen LD von $60 \mu\text{m}$ unter hypoosmotischen Bedingungen zu einer Kugel an, verringerte sich der LD (d) auf $40 \mu\text{m}$. Das Kugelvolumen (V_h) errechnete sich dabei

$$v_h = \frac{4}{3} \cdot \tilde{h} \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2$$

auf 33 500 μm^3 und die Oberfläche (o_h)

$$o_h = 4 \cdot \tilde{h} \cdot \left(\frac{d}{2}\right)^2$$

auf 5 030 μm^2 . Die Oberfläche blieb demnach weitgehend konstant (Vergrößerung 5 %), während das Volumen stark zunahm (Vergrößerung 158 %).

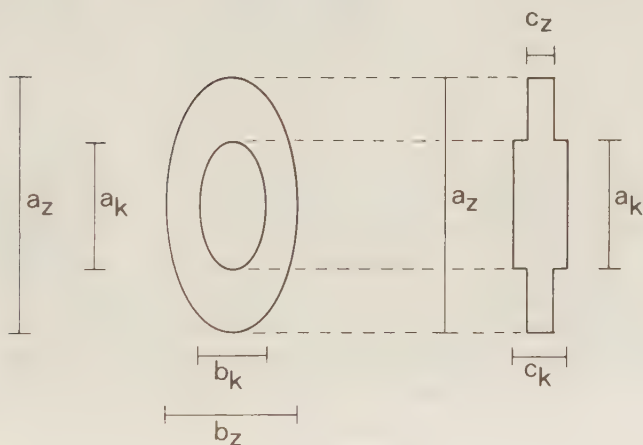


Abb. 19: Mittlere Durchmesser der Amphiuma-Erythrozyten (μm)

$$a_z = 60, a_k = 30, b_z = 35, b_k = 20,$$

$$c_z = 6, c_k = 12,5$$

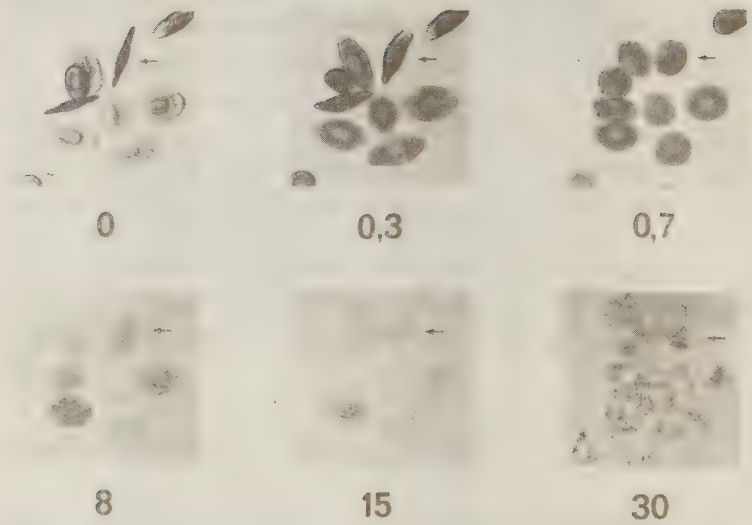


Abb. 20: Gestaltänderung von Amphiuma-Erythrozyten in Abhängigkeit der Zeit (min) bei Perfusion mit hypoosmolaler Lösung (KCL, Tab. I).

6.0 Zusammenfassung

Erythrozyten der Amphibienart *Amphiuma means tridactylum* Cuvier wurden über 30 min verschiedenen hypoosmotischen Lösungen ausgesetzt. Die ellipsoiden Zellen reagierten mit einer deutlichen Volumenzunahme, sichtbar an der Formänderung zu einer Kugel und meßbar an der Abnahme des Längsdurchmessers (LD). Der LD wurde an Einzelzellen mikroskopisch gemessen. Nach dem Anschwellen (Maximum 2,5 min) nahm das Zellvolumen in einer zweiten Phase spontan wieder ab, um nach 20 min den Ausgangswert zu erreichen. Diese Volumenregulation erfolgte nur, wenn das extrazelluläre Medium Ca^{++} -Ionen enthielt. Das Spindelgift Vincristinsulfat verhinderte die Zellschwellung. Das gegen Mikrofilamente gerichtete Cytochalasin B hatte weder einen Einfluß auf die Volumenzunahme noch auf die nachträgliche Volumenregulation. Bei erhöhter K^+ im Medium fand keine Volumenregulation statt und die Zellen hämolysierten in der hypoosmolalen Lösung. Die vernetzende Substanz Dimethyladipimidat, die die Permeabilität für K^+ verringert, verzögerte die Volumenregulation. Die Ergebnisse zeigen, daß die Volumenregulation eher durch einen osmotischen als durch einen kontraktilen Mechanismus erfolgt. Ca^{++} -Ionen bedingen die Volumenregulation, indem sie wahrscheinlich den K^+ -Ausstrom aus der Zelle fördern und dadurch intrazellulär die Anzahl osmotisch wirksamer Teilchen verringern.

7.0 Literatur

- 1) Baker, C.L.: The natural history and morphology of *Amphiumae*. J. Tenn. Acad. Sci. 2: 55-91 (1945)
- 2) Baker, C.L.: The species of *Amphiumae*. J. Tenn. Acad. Sci. 22: 9-21 (1947)
- 3) Behn, C., Lübbemeier, A., Weskamp, P.: Chlorotetracycline induces calcium mediated shape changes in human erythrocytes. Pflügers Arch. 372: 259-268 (1977)
- 4) Bentley, P.J.: Cutaneous respiration in the congo eel *Amphiuma means* (Amphibia: Urodela). Comp. Biochem. Physiol. 50A: 121-124 (1975)
- 5) Boone, M.A.: Cell size in *Amphiuma*. J. Tenn. Acad. Sci. 21: 14-17 (1946)
- 6) Bretscher, M.S., Raff, M.C.: Mammalian plasma membranes. Nature 258: 43-49 (1975)
- 7) van den Brenk, H.A.S., Stone, M.G.: Actions and interactions of colchicine and cytochalasin B on contraction of granulation tissue and on mitosis. Nature 251: 327-329 (1974)
- 8) Bunch, W.H.: The effect of DMSO on the permeation of non-electrolytes through the barnacle cell membrane. J. cell. Physiol. 72: 49-54 (1968)
- 9) Chang, Y.C.: The electrical properties of the membrane of the *Amphiuma* red blood corpuscles. Rev. Biol. Lisboa 5: 119-126 (1964-65)

- 10) Colombe, B.W., Macey, R.I.: Effects of calcium on potassium and water transport in human erythrocyte ghosts. *Biochim. Biophys. Acta* 363: 226-239 (1974)
- 11) Croop, J., Holtzer, H.: Response of myogenic and fibrogenic cells to cytochalasin B and to colcemid. *J. Cell Biol.* 65: 271-285 (1975)
- 12) Dellasega, M., Grantham, J.J.: Regulation of renal tubule cell volume in hypotonic media. *Amer. J. Physiol.* 224: 1288-1294 (1973)
- 13) Determann, H., Lepusch, F.: *Das Mikroskop und seine Anwendung.* Leitz-Wetzlar 512-69 b
- 14) Dunn, M.J.: Red blood cell calcium and magnesium: effects upon sodium and potassium transport and cellular morphology. *Biochim. Biophys. Acta* 352: 97-116 (1974)
- 15) Dutton, A., Adams, M., Singer, S.J.: Bifunctional Imidoesters as cross-linking reagents. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 23: 730-739 (1966)
- 16) Evans, E.A., Waugh, R., Melnic, L.: Elastic area compressibility modulus of red cell membrane. *Biophys. J.* 16: 585-595 (1976)
- 17) Fishman, R.A.: Brain edema. *New Engl. J. Med.* 293: 706-711 (1975)
- 18) Flores, J., BiBona, D.R., Beck, C.H., Leaf, A.: The role of cell swelling in ischemic renal damage and the protective effect of hypertonic solute. *J. Clin. Invest.* 51: 118-126 (1972)

- 19) Flores, J., DiBona, D.R., Fraga, N., Leaf, A.: Cell volume regulation and ischemic tissue damage. *J. Membrane Biol.* 10: 331-343 (1972)
- 20) Fugelli, K.: Regulation of cell volume in flounder erythrocytes accompanying a decrease in plasma osmolarity. *Comp. Biochem. Physiol.* 22: 253-260 (1967)
- 21) Gardos, G.: The function of calcium in the potassium permeability of human erythrocytes. *Biochim. Biophys. Acta* 30: 653-654 (1958)
- 22) Gitler, C.: Plasticity of biological membranes. In: *Ann. Rev. Biophys. Bioengineering* 1: 51-92 (1972), Ed: Morales, M.F.; *Ann. Rev. Inc.*, Palo Alto, Calif.
- 23) Gräßman, A.: Mikrochirurgische Zellkerntransplantation bei Säugetierzellen. *Exp. Cell Res.* 60: 373-382 (1970)
- 24) Grantham, J.J., Lowe, C.M., Dellasega, M., Cole, B.R.: Effect of hypotonic medium on K and Na content of proximal renal tubules. *Amer. J. Physiol.* 232: F42-F49 (1977)
- 25) Hansen, L., Teuscher, U., Giebisch, G., Wiederholt, M.: Relation between peritubular membrane potential and net fluid reabsorption in the distal renal tubule. In Vorbereitung
- 26) Jennings, R.B.: Cell volume regulation in acute myocardial ischemic injury. *Acta med. scand. Suppl.* 587: 83-92 (1975)
- 27) Johansen, K.: Cardiovascular dynamics in the amphibian *Amphiuma tridactylum* Cuvier. *Acta physiol. scand.* 60: Suppl. 217 (Oslo 1963)

- 28) Juliano, R.L., Kimelberg, H.K., Papahadjopoulos, D.: Synergistic effects of a membrane protein (spectrin) and Ca^{2+} on the Na^{+} permeability of phospholipid vesicles. *Biochim. Biophys. Acta* 241: 894-905 (1971)
- 29) Kleinzeller, A.: The volume regulation in some animal cells. *Arch. Biol. (Liège)* 76: 217-232 (1965)
- 30) Knauf, P.A., Riordan, J.R., Schuhmann, B., Wood-Guth, I., Passow, H.: Calcium-potassium-stimulated net potassium efflux from human erythrocyte ghosts. *J. Membrane Biol.* 25: 1-22 (1975)
- 31) Kregenow, F.M.: The response of duck erythrocytes to nonhemolytic hypotonic media. *J. Gen. Physiol.* 58: 372-395 (1971)
- 32) Krinsky, N.I., Bymun, E.N., Packer, L.: Retention of K^{+} gradients in Imidoester cross-linked erythrocyte membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* 160: 350-352 (1974)
- 33) Lake, W., Rasmussen, H., Goodman, D.B.P.: Effect of ionophore A 23187 upon membrane function and ion movement in human and toad erythrocytes. *J. Membrane Biol.* 32: 93-113 (1977)
- 34) Lang, M.A., Gainer, H.: Volume control by muscle fibers of the blue crab. *J. Gen. Physiol.* 53: 323-341 (1969)
- 35) Lassen, U.V., Pape, L., Vestergaard-Bogind, B., Bengtson, O.: Calcium-related hyperpolarization of the *Amphiuma* red cell membrane following micropuncture. *J. Membrane Biol.* 18: 125-144 (1974)

- 36) Lassen, U.V., Pape, L., Vestergaard-Bogind, B.:
Effect of calcium on the membrane potential
of *Amphiuma* red cells. *J. Membrane Biol.*
26: 51-70 (1976)

- 37) Lepke, S., Passow, H.: Hemmung des Kaliumverlustes
fluoridvergifteter Erythrozyten durch Komplex-
bildner. *Pflügers Archiv* 271: 389-396 (1960)

- 38) Lin, S., Spudich, J.A.: On the molecular basis of
action of cytochalasin B. *J. Supramol. Struct.*
2: 728-736 (1974)

- 39) Livne, A., Kuiper, P.J.C.: Unique properties of the
camel erythrocyte membrane. *Biochim. Biophys.*
Acta 318: 41-49 (1973)

- 40) Lovelock, J.E., Bishop, M.W.H.: Prevention of
freezing damage to living cells by Demethyl
Sulfoxide. *Nature* 183: 1394-1395 (1959)

- 41) Lucké, B.: The living cell as an osmotic system
and its permeability to water. *Cold Spr. Harb.*
Symp. quant. Biol. 8: 123-132 (1940)

- 42) Lucké, B.; McCutcheon, M.: The living cell as an
osmotic system and its permeability to water.
Physiol. Rev. 12: 68-139 (1932)

- 43) Macallum, A.B.: The paleochemistry of the body
fluids and tissues. *Physiol. Rev.* 6: 316-357
(1926)

- 44) Marchesi, V.T., Furthmayr, H.: The red cell membrane.
Ann. Rev. Biochem. 45: 667-698 (1976)

- 45) Meryman, H.T.: Preservation of living cells.
Fed. Proc. 22: 81-89 (1963)
- 46) Monnickendam, M.A., Balls, M.: The relationship
between cell sizes, respiration rates and
survival of amphibian tissues in long-term
organ cultures. Comp. Biochem. Physiol. 44A:
871-880 (1973)
- 47) Niehaus, W.G., Wold, F.: Cross-linking of erythro-
cyte membranes with Dimethyl Adipimide.
Biochim. Biophys. Acta 196: 170-175 (1970)
- 48) Palek, J., Curby, W.A., Lionetti, F.J.: Relation of
 Ca^{2+} -activated ATPase to Ca^{2+} -linked shrinkage
of human red cell ghosts. Amer. J. Physiol.
220: 1028-1032 (1971)
- 49) Pape, L., Kristensen, B.I., Bengtson, O.: Sialic acid,
electrophoretic mobility and transmembrane
potential of the Amphiuma red cell. Biochim.
Biophys. Acta 406: 516-525 (1975)
- 50) Parker, J.C.: Dog red blood cells; Adjustment of
density in vivo. J. gen. Physiol. 61: 146-
157 (1973)
- 51) Parker, J.C.: Dog red blood cells; Adjustment of
salt and water content in vitro. J. gen. Physiol.
62: 147-156 (1973)
- 52) Parker, J.C., Gitelman, H.J., Glosson, P.S.,
Leonard, D.L.: Role of calcium in volume
regulation by dog red blood cells. J. gen.
Physiol. 65: 84-96 (1975)

- 53) Pierce, S.K., Greenberg, M.J.: The nature of cellular volume regulation in marine bivalves. J. exp. Biol. 57: 681-692 (1972)
- 54) Powell, W.J., DiBona, D.R., Flores, J., Leaf, A.: The protective effect of hyperosmotic mannitol in myocardial ischemia and necrosis. Circulation 54: 603-615 (1976)
- 55) Ralston, G.B.: Proteins of the camel erythrocyte membranes. Biochim. Biophys. Acta 401: 83-94 (1975)
- 56) Rangachari, P.K., Daniel, E.E., Paton, D.M.: Regulation of cellular volume in rat myometrium. Biochim. Biophys. Acta 323: 297-308 (1973)
- 57) Reynolds, J.A.: Are inorganic cations essential for the stability of biological membranes. Ann. N. Y. Acad. Sci. 195: 75-85 (1972)
- 58) Riordan, J.R., Passow, H.: Effects of calcium and lead on potassium permeability of human erythrocyte ghosts. Biochim. Biophys. Acta 249: 601-605 (1971)
- 59) Romero, P.J.: Role of membrane-bound Ca in ghost permeability to Na and K. J. Membran Biol. 29: 329-343 (1976)
- 60) Rosenthal, A.S., Kregenow, F.M., Moses, H.L.: Some characteristics of a Ca^{2+} -dependent ATPase activity associated with a group of erythrocyte membrane proteins which form fibrils. Biochim. Biophys. Acta 196: 254-262 (1970)

- 61) Rubalcava,B., Munoz,D.M., Gitler,C.: Interaction of fluorescent probes with membranes. Effect of ions on erythrocyte membranes. Biochemistry 8: 2742-2747 (1969)
- 62) Schoffeniels,E.: Cellular aspects of membrane permeability. Int. Ser. Monogr. Pure Appl. Biol. 28: Pergamon Press (1967)
- 63) Schmidt-Nielsen,B., Schmidt-Nielsen,K., Houpt,T.R., Jarnum,S.A.: Water balance of the camel. Amer. J. Physiol. 185: 185-194 (1956)
- 64) Smith,H.M.: Cell size and metabolic activity in amphibia. Biol. Bulletin 48: 347-378 (1925)
- 65) Steck,T.L.: The organization of proteins in the human red blood cell membrane. J. Cell Biol. 62: 1-19 (1974)
- 66) Stobbe,H., Freytag,G.E.: Zur vergleichenden Zyto-morphologie des Blutes. Acta biol. med. germ. 2: 534-549 (1962)
- 67) Tilney,L.G., Detmers,P.: Actin in erythrocyte ghosts and its association with spectrin. J. Cell Biol. 66: 508-520 (1975)
- 68) Weed,R.I., LaCelle,P.L., Merrill,E.W., Craib,G., Gregory,A., Karch,F., Pickens,F.: Metabolic dependence of red cell deformability. J. Clin. Invest. 48: 795-809 (1969)
- 69) Weiß,G., Haberich,F.J.: Die Zellen des Froschblutes im Phasenkontrastmikroskop. Blut 7: 1-13 (1961)

- 70) Wessels, N.K., Spooner, B.S., Ash, J.F., Brandley, M.O.,
Ludueno, M.A., Taylor, E.L., Wrenn, J.T.,
Yamada, K.M.: Microfilaments in cellular
and developmental processes. *Science* 171:
135-143 (1971)
- 71) Whittam, R.: Control of membrane permeability to
potassium in red blood cells. *Nature* 219:
610 (1968)
- 72) Whittam, G., Grantham, J.J.: Cellular aspects of
renal sodium transport and cell volume regulation.
Kidney Internat. 2: 103-120 (1976)
- 73) Wiederholt, M.: Beitrag zum Mechanismus des Natrium-
und Kalium-Transportes in der Niere. Habilita-
tionsschrift aus dem Institut für Klinische
Physiologie der FU Berlin (1969)
- 74) Wintrobe, M.M.: Variations in the size and hemoglobin
content of erythrocytes in the blood of various
vertebrates. *Folia haemat.* (Lpz) 51: 32-49
(1933)
- 75) Wintrobe, M.M.: In: *Clinical Hematology*; Ed. Wintrobe,
M.M., H. Kpmpton Publishers, London (1974)
p. 1808

Bedanken möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. K. Hierholzer und dem Direktorium, daß mir die Arbeit im Institut für Klinische Physiologie ermöglicht wurde.

Ich habe dort sehr gerne gearbeitet und danke allen Institutsmitgliedern für ihre Hilfe und Diskussionsbereitschaft bei Durchführung der Arbeit, insbesondere Frau A. Krolik und Herrn Dr. L. Hansen.

Mein besonderer Dank gilt Herrn Privatdozent Dr. C. Behn für die Überlassung des Themas, für die Einführung und Förderung in wissenschaftlicher Arbeit und für die stete Bereitschaft anstehende Probleme zu diskutieren und zu lösen.

L E B E N S L A U F

Hans-Dieter Ledwa	6951 Billigheim Hainweg 26
geboren am	07. Dezember 1946
in	Berlin
Familienstand	ledig
Eltern	Joachim Ledwa, Ingenieur gestorben am 31. Juli 1973 Ursula Ledwa geb. Scholz Hausfrau
Schulen	1953 - 1957 Grundschule 1957 - 1966 Gymnasium
Reifeprüfung	5. Oktober 1966 in Heilbronn
Bundeswehrdienstzeit	3.1.1967 - 2.1.1969
Universitätsstudium	9. Juni 1969 Aufnahme an der F.U. Berlin, Studienfach Medizin
Auslandsstudium	Studienjahr 1972/73 Universität Rennes/Frankreich
Prüfungen	20. März 1970 naturwissen- schaftliche Vorprüfung 24. August 1971 ärztliche Vorprüfung 21. August 1975 ärztliche Prüfung
Medizinalassistentenzeit	4 Monate in der Chirurgischen Klinik, F.U. Berlin, Klinikum Steglitz 13 Monate im Institut für Klinische Physiologie im Klinikum Steglitz 2 Monate in der Medizinischen Klinik der F.U. Berlin im Klinikum Steglitz

